

H.S.



Law Offices of  
**SCHNECK & SCHNECK**

Thomas Schneck  
David M. Schneck  
Gina McCarthy  
Nissa Strottman

Of counsel:  
Boris G. Tankhilevich

P.O. BOX 2-E  
SAN JOSE, CALIFORNIA 95109-0005

80 S. Market Street  
Third Floor  
San Jose, California 95113-2303

Email: [webmail@patentvalley.com](mailto:webmail@patentvalley.com)

Telephone: (408) 297-9733

Facsimile: (408) 297-9748

Patents and Trademarks

January 8, 2004

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, Virginia 22313-1450

Re: Certified Priority Document  
Serial No.: 10/687,788  
Filed: October 17, 2003  
For: SAMPLE FOR MANIPULATION BY AN OPTICAL TWEEZER,  
AND A METHOD AND DEVICE TO GENERATE OPTICALLY  
INDUCED FORCES  
Our ref: SHA-001 (S. Monajembashi)

Dear Sir or Madam:

Transmitted herewith for the above-identified patent application is a certified copy of the priority document, German application no. 203 06 138.1, filed April 16, 2003.

Respectfully submitted,

CERTIFICATE OF MAILING

I hereby certify that this paper (along with any paper referred to as being attached or enclosed) is being deposited with the United States Postal Service on the date shown below with sufficient postage as first class mail in an envelope addressed to: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450.

Signed: Merle P. Garcia  
Typed Name: Merle P. Garcia

Date: January 8, 2004

Thomas Schneck  
Reg. No. 24,518

Schneck & Schneck  
P.O. Box 2-E  
San Jose, CA 95109-0005  
(408) 297-9733

TS:mpg  
Encl: Certified priority document  
cc: S. Monajembashi w/o encl.

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Gebrauchsmusteranmeldung



**Aktenzeichen:** 203 06 138.1

**Anmeldetag:** 16. April 2003

**Anmelder/Inhaber:** Dr. Shamci Monajembashi,  
Heidelberg, Neckar/DE

**Bezeichnung:** Präparat, insbesondere für die Handhabung mittels  
einer optischen Pinzette, sowie Verfahren und Vor-  
richtung zur Erzeugung von optisch induzierten  
Kräften



**IPC:** A 61 K 41/00

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Gebrauchsmusteranmeldung.**

München, den 3. Dezember 2003  
**Deutsches Patent- und Mark namt**  
**Der Präsident**

Im Auftrag

  
**Letang**

**MEISSNER, BOLTE & PARTNER**

Anwaltssozietät GbR

Anmelder:

Dr. Shamci Monajembashi  
Turnerstraße 116  
69126 Heidelberg

Adress :

Hollerallee 73  
D-28209 Bremen  
Telefon +49-421-348740  
Telefax +49-421-342296

Unser Zeichen: MJB-11-DE

Datum: 16. April 2003/7521

---

Präparat, insbesondere für die Handhabung mittels einer optischen Pinzette, sowie  
Verfahren und Vorrichtung zur Erzeugung von optisch induzierten Kräften

---

Beschreibung:

- Die Erfindung betrifft ein Präparat, insbesondere für die Handhabung mittels einer optischen Pinzette, enthaltend ein oder mehrere Zielobjekte und ein oder mehrere Hilfsobjekte, wobei mindestens ein Hilfsobjekt mindestens einem Zielobjekt zugeordnet ist. Daneben betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Erzeugung von optisch induzierten
- 5 mechanischen Kräften auf dehnbare oder deformierbare Zielobjekte unter Verwendung von Hilfsobjekten. Schließlich betrifft die Erfindung auch eine Vorrichtung zur Erzeugung von optischen Kräften im Fokus einer optischen Pinzette auf dehnbare oder deformierbare Zielobjekte wie z.B. biologische Zellen.
- 10 Die mechanische Deformation von Zellen kann zur Bestimmung viskoelastischer Parameter herangezogen werden. Da eine Vielzahl dynamischer Prozesse (Wachstum, Substratanhaftung, Migration, Phagocytose) mit einer veränderten zellulären Viskoelastizität verbunden sind, lassen sich aus den mechanischen Eigenschaften einer Zelle wertvolle Rückschlüsse auf diverse Vitalparameter ziehen. Da für die Elastizität der
- 15 meisten Zellen der Cytoskelett-Baustein Aktin eine entscheidende Rolle spielt, könnte die gezielte Deformation von Zellen bei der Untersuchung von Krankheiten, die mit Abnormalitäten des Cytoskeletts verbunden sind, Anwendung finden.

20071004

Darüber hinaus ist das Verfahren auch für Untersuchungen zur Mechanosensitivität und zur Mechanotransduction geeignet. Sowohl Einzelzellen als auch Zellen innerhalb eines Gewebes sind in der Lage, auf intra- und extrazelluläre Kräfte zu reagieren (Mechanosensitivität) und dann eine Signalkette in Gang zu setzen (Mechanotransduction). Die Bedeutung zellulärer Mechanosensoren (z.B. Cytoskelett, mechanisch kontrollierte Ionenkanäle, Integrine) können mit dieser Methode ebenso untersucht werden, wie die Rolle von Signalmolekülen (z.B. freies interzelluläres Calcium).

Die Methoden, die bisher zur mechanischen Manipulation von Zellen verwendet wurden, lassen sich in Massenzell- und Einzelzelltechniken unterteilen. Massenzelltechniken wie beispielsweise das *Membranstretching* (Endlich N., Kress K. K., Reiser J., Uttenweller D., Kritz W., Muel P., Endlich K. [2001] *Podocytes respond to mechanical stress in vitro*. J. Am. Soc. Nephrol. 12, 413-422) oder die *Magnetic Manipulator Workstation* (Huang H., Dong C. Y., Kwon H.-S., Sutln J. D., Kamm R. D., So P. T. C. [2002] *Three-dimensional cellular deformation analysis with a two-photon magnetic manipulator workstation*. Biophys. J. 82, 2211-2223), bei denen eine Kraft auf eine Vielzahl von Zellen gleichzeitig ausgeübt wird, sind nicht geeignet, um individuelle Zellen, bestimmte Zellareale oder die Reaktionen der Nachbarzelle als Folge der Mechanotransduktion zu untersuchen. Darüber hinaus erlauben nur Einzelzellversuche eine Unterscheidung zwischen lokalen und globalen Effekten.

Der *Optical Stretcher* (Guck, J., Ananthakrishnan R., Mahmood H., Moon T. J., Cunningham C. C., Käs, J. [2001] *The optical stretcher: A novel laser tool to micromanipulate cells*. Biophys. J. 81, 767-784), die *Doppelstrahlfalle* (Henon, S., Lenormand, G., Richert, A., Gallet, [1999] *A new determination of the shear modulus of the human erythrocyte membrane using optical tweezers*. Biophys. J. 76, 1145-1151) und die *Micropipette Aspiration* Technik (Hochmuth, R. M. [2000] *Micropipette aspiration of living cells* J. Biochem. 33, 15-22) sind nur für Untersuchungen an suspendierten, jedoch nicht an adhärennten Einzelzellen geeignet. Alle Methoden, die auf der *Atomic Force Microscopy* (AFM)-Technik beruhen wie das *Elastic Force Mapping* (Rotsch, C., Radmacher, [2000] *M. drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: An Atomic Force Microscopy study*. Biophys. J. 78, 520-535) oder die *AFM-Indentation* (Guillaume T. Charras and Mike A. Horton (200). *Single Cell Mechanotransduction and its modulation analyzed by atomic force microscope indentation*. Biophysical Journal 82, 2970-2981) ermöglichen keine durchlichtmikroskopische Beurteilung der erzielten Deformation, um

beispielsweise eventuell induzierte Zellschäden ausschließen zu können. Außerdem sind fluor szenzmikroskopische Untersuchungen nur bei einer Kombination von LSM (Laser Scanning Microscopy) und AFM möglich. Der Einsatz magnetischer Manipulatoren (*Magnetic Tweezers*) wiederum ist auf die Untersuchung adhärenter Zellen beschränkt und erfordert entweder die Aufnahme magnetischer Beads durch Phagocytose (Bausch A., Ziemann F., Boulbitch A.A., Jacobson K., Sackmann E. [1998]. **Local measurement of viscoelastic parameters of adherent cell surfaces by magnetic bead microrheology**, *Biophys. J.* 75, 2038-2049) oder eine spezielle Beschichtung der Magnetkugeln, um eine Anhaftung an Zelloberflächen zu gewährleisten (Glogauer M., Ferrier J. [1998]. **A new method for application of force to cells via ferric oxide beads**, *Eur J. Physiol.* 435, 320-327).

Die Erfindung geht aus von den optisch induzierten Kräften in einer optischen Pinzette zur Übertragung von Kräften auf dehnbare/deformierbare Objekte. Der Einsatz der optischen Pinzette in der biologischen und medizinischen Forschung ist in den letzten Jahren stetig gewachsen. Da die optische Pinzette in der Regel mit fokussiertem Laserstrahl (außer Käs-Methode) arbeitet, und die maximale Kraft, die zum Fixieren von Objekten benötigt wird, im Strahlfokus, der nur einen Durchmesser von 1µm hat, konzentriert ist, können in der Regel ohne ein Hilfsmittel (z.B. Latex beads) kaum große Scherkräfte an Biomembranen ausgeübt werden. Im Falle von Osteoblasten, wie von Walker L.M., Holm A., Cooline L., Maxwell L., Öberg A., Sundqvist T., El Haj A.J. [1999], **Mechanical manipulation of bone and cartilage cells with optical tweezers**, *FEBS Letters* 459, 39-42 beschrieben, genügt der Lichtdruck der optischen Pinzette (7 pN) um die Zellen mechanisch zu stimulieren. Dies kann jedoch nicht für alle Zelltypen verallgemeinert werden, so dass der Einsatz einer optischen Pinzette allein zur mechanischen Manipulation von Zellen nicht stets ausreicht.

Gegenüber dem Stand der Technik liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein Präparat, eine Vorrichtung und ein entsprechendes Verfahren anzugeben, mit dem eine mechanische Manipulation insbesondere von Einzelzellen und vorzugsweise unabhängig von ihrem Typ und ihrer Form durchführbar ist.

Das erfindungsgemäße Präparat ist dadurch gekennzeichnet, dass die Hilfsobjekte Hämoglobin enthalten. In Versuchen hat sich herausgestellt, dass derartige Hilfsobjekte besonders gut für die Manipulation mittels einer optischen Pinzette geeignet sind, insbesondere im Hinblick auf die übertragbaren Kräfte. Vorzugsweise hatten die

Hilfsobjekte an dem Zielobjekten. Dabei kann je einem Zielobjekt je ein Hilfsobjekt zugeordnet sein. Auch kann ein Zielobjekt mehrere Hilfsobjekte aufweisen.

5 Nach einem weiteren Gedanken der Erfindung weisen die Hilfsobjekte jeweils eine bikonkave Form auf. Die Verbindung zwischen Hilfsobjekten und Zielobjekten wird dadurch weiter verbessert, insbesondere die Möglichkeit der Haftung.

10 Vorteilhafterweise handelt es sich bei den Hilfsobjekten um rote Blutkörperchen (Erythrozyten). Es hat sich herausgestellt, dass Erythrozyten geeignete Hilfsobjekte zum Festhalten im Fokus einer optischen Pinzette sind. Gründe hierfür sind vermutlich die bikonkave Form der Erythrozyten und die dielektrischen Eigenschaften (große Dielektrizitätskonstante) von Hämoglobin. Die Erythrozyten werden als "Kraftübertragungswerkzeuge" auf die Oberfläche der Zielzellen aufgebracht. Bei Ausübung einer Kraft auf die Erythrozyten werden diese bewegt und deformieren dadurch die anhaftenden  
15 Zielobjekte.

Als Hilfsobjekte können auch Liposomen vorgesehen sein, die Hämoglobin enthalten.

20 Nach einem weiteren Gedanken der Erfindung sind die Hilfsobjekte mit einer Substanz beschichtet, deren Oberflächenladung (Vorzeichen) der Oberflächenladung (Vorzeichen) der Zielobjekte entgegengerichtet ist. So ist es möglich, Hilfsobjekte zu verwenden, deren Oberflächenladung mit der Oberflächeladung der Zielobjekte gleich gerichtet ist. Durch die Beschichtung mit der beschriebenen Substanz wird die Oberflächenladung umgekehrt.

25 Nach einem weiteren Gedanken der Erfindung sind als Substanz zur Beschichtung positiv geladene Polymere vorgesehen, die keine reaktiven Gruppen aufweisen. Vorzugsweise handelt es sich um wasserlösliche Polymere.

30 Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform sind die Hilfsobjekte mit Polyethylenimid oder Poly-L-Lysin beschichtet. Tests haben eine gute Eignung der genannten Substanzen ergeben.

35 Vorteilhafterweise sind als Zielobjekte biologische Zellen vorgesehen. Diese können adhärent an einem Träger, etwa einem Deckglas, haften oder als Suspensionszellen vorgesehen sein. Auch können fixierte oder native Zellen Verwendung finden. Vorzugsweise haften die Hilfsobjekte auf den Zielobjekten, während letztere auf dem Träger haften.

In vielen Fällen haften die Erythrozyten nicht an der Zielzelle, da beide Membranen gleiche Ladung (negativ) besitzen. Um die Anhaftung der roten Blutkörperchen an der Zielzelle zu erreichen, werden Erythrozyten mit beispielsweise Polyethylenimid behandelt bzw. beschichtet. Hierzu können auch andere Substanzen, die freie positive Ladung haben und keine reaktive Gruppe enthalten, verwendet werden, d.h. auch Substanzen wie z. B. Poly-L-Lysin, die in der Regel für die Anhaftung von Zellen an Glas (Objektträger) benutzt werden. Es ist möglich sowohl mit fixierten (Konservierung mittels Formaldehyd oder Glutaraldehyd) als auch mit unfixierten (d.h. nativen) Erythrozyten zu arbeiten. Es ist jedoch aus praktischen Gründen zu empfehlen mit fixierten Erythrozyten zu arbeiten (einmaliger Aufwand für eine Vielzahl von Versuchen).

Mit membranumhülltem Hämoglobinsack (z.B. Liposomen, die Hämoglobin beinhalten) läßt sich ein ähnlicher Effekt wie bei den Erythrozyten erzielen.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass die Hilfsobjekte Hämoglobin enthalten. Bevorzugte Hilfsobjekte sind rote Blutkörperchen oder andere Hilfsobjekte, die Hämoglobin enthalten, wie (spezielle) Liposomen. Bevorzugt werden runde/bikonkave Hilfsobjekte.

Vorteilhafterweise werden die Hilfsobjekte vor dem Aufbringen auf die Zielobjekte mit Substanzen beschichtet, die eine Oberflächenladung ändern, derart, dass Zielobjekte einerseits und Hilfsobjekte andererseits nach der Beschichtung Oberflächenladungen mit unterschiedlichen Vorzeichen aufweisen.

So kann die Membran von fixierten/unfixierten Erythrozyten bzw. Liposomen mittels Polyethylenimid oder ähnlichen Substanzen, etwa Poly-L-Lysin oder anderen wasserlöslichen positiv geladenen Polymeren, die keine reaktiven Gruppen besitzen, beschichtet werden. Dadurch wird die Membranoberflächenladung der Erythrozyten vom Negativen ins Positive verändert.

Vorteilhafterweise haften die Hilfsobjekte an den Zielobjekten. Die Haftung wird gerade durch die beschriebene Beschichtung erleichtert oder sogar gewährleistet. Dies gilt insbesondere für Erythrozyten bzw. Liposomen als Hilfsobjekte und adhärente Zellen oder Suspensionszellen als Zielobjekte.

2

Nach einem weiteren Gedanken der Erfindung ist vorgesehen, dass ein Zielobjekt, an dem mindestens ein Hilfsobjekt haftet, mittels zweier optischer Strahlen deformiert/gedehnt wird. Insbesondere geht es um die Verformung und Dehnung von Suspensionszellen, an denen jeweils mindestens ein Erythrozyt haftet. Ein optischer Strahl wirkt auf das Zielobjekt, während der andere Strahl das Hilfsobjekt beaufschlagt. Durch Relativbewegung der Strahlen und/oder Änderung der Fokussierung zieht/drückt das Hilfsobjekt am Zielobjekt.

10 Die erfindungsgemäße Vorrichtung ist gekennzeichnet durch Einkopplung eines einfachen oder eines mehrfachen Laserstrahls der optischen Pinzette im Strahlengang eines Mikroskops, sodass das Zielobjekt in den Strahlfokus gezogen bzw. hineingedrückt wird. Als Zielobjekte sind vorzugsweise biologische Zellen vorgesehen. Insbesondere ist ein EPI-Fluoreszenz-Strahlengang beteiligt.

15 Nach einem weiteren Gedanken der Erfindung ist ein langwelliger Laserstrahl direkt oder mittels Lichtwellenleiter über ein Linsensystem (Laserstrahlaufweitungsoptik) in das Mikroskop bzw. die optische Pinzette einkoppelbar. Als "langwellig" wird insbesondere eine Wellenlänge zwischen 700 und 1100 nm verstanden.

20 Das Linsensystem besteht vorzugsweise aus zwei Linsen, wobei eine der Linsen (eine Streulinse) entfallen kann, wenn das Licht über einen Lichtwellenleiter eingekoppelt wird. Dieser hat auf Grund seiner eigenen Charakteristik die Wirkung einer Streulinse. Die zweite Linse ist dann an die Charakteristik des Lichtwellenleiters angepasst.

25 Eine weitere Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist gekennzeichnet durch optische Elemente zum Aufsplitten des Laserstrahls und zur Bildung einer Multistrahl-Pinzette. Als optische Elemente sind vorzugsweise galvanische Spiegel vorgesehen, die im Anschluss an eine Laserstrahlaufweitungsoptik wirksam sind. Die galvanischen Spiegel sind mit einem geeigneten Antrieb versehen, der durch eine geeignete Software programmgesteuert ist.

30  
35 Vorteilhafterweise ist das Mikroskop ein CLSM (Confocal Laser Scanning Microscope). Möglich ist so eine simultane Durchführung von Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie. Beispielsweise können das mechanische Verhalten biologischer Zellen sowie deren mechanisch kontrollierte Ionenkanäle simultan untersucht werden.

Nachfolgend wird die Erfindung anhand von Experimenten erläutert :



Die mit Polyethylenimid (PEI) beschichteten Erythrozyten werden auf die Zielzellen gegeben und für 10-20 min bei 37°C inkubiert. Danach werden die Zellen mit frischem Zellmedium (RPMI) gewaschen, um die nicht angehafteten Erythrozyten zu entfernen. Für die mechanosensitive Ionenkanal-Untersuchungen, wie z.B. Kalzium-Kanäle, werden spezielle Puffer verwendet (kalziumhaltige Puffer).

Über die Erythrozyten als Kraftüberträger wird mit der optischen Pinzette auf verschiedene Zellen (Bindegewebszellen, Epithelzellen, Pankreaszellen - adhären- te Zellen oder Suspensionszellen) gedrückt bzw. gezogen. Dabei ist eine mikroskopisch deutliche Deformation ohne erkennbare Zellschäden detektierbar. Als Antwort auf die mechanische Stimulation reagieren alle untersuchten Zellen mit einem drastischen Anstieg der intrazellulären Kalzium-Ionen Konzentration. Es ist möglich, sowohl mit fixierten als auch mit unfixierten Erythrozyten zu arbeiten.

Die entsprechenden Experimente an unterschiedlichen, adhären- ten Zellen unter gleichen Bedingungen mit Latexkügelchen bzw. Glaskügelchen (verschiedene Größen: 1µm, 5µm und 10 µm) und Lymphozyten bei gleicher Laserleistung zeigen ein negatives Ergebnis (d.h. keine deutlich sichtbare Deformation der Zellmembran). Erst bei deutlich höherer Laserleistung (das Fünffache) war eine minimale Deformation der Zellmembran zu erkennen.

Nur mit der Erfindung ist es möglich, adhären- te Zellen um einige Mikrometer zu deformieren. Es ist ebenso möglich, mechanosensitive Ionenkanäle zu aktivieren, was z. B. durch einen sehr deutlichen Anstieg des Kalziums im Zellinneren nach der Laserdeformierung nachzuweisen ist. Diese Experimente wurden an verschiedene Zelltypen (L929, PtK, Nierenzellen, Acinuszellen) erfolgreich durchgeführt.

Das Einkoppeln einer sogenannten „Multitrap“, einer optischen Pinzette, bei der ein oder mehrere Laserstrahlen zur Fixierung auf mehrere Objekte gelenkt werden, ermöglicht Deformierungsexperimente nicht nur an adhären- ten Zellen (gleichzeitige Stimulation mehrerer Zellen oder einer Zelle an mehreren Stellen), sondern auch an Suspensionszellen. Eine Multistrahle-Pinzette kann auch dadurch realisiert werden, dass mit Hilfe eines Scannerspiegels ein Strahl abwechselnd in hoher Frequenz auf mehrere Objekte gelenkt wird, so dass diese fixiert bleiben, auch wenn der Laserstrahl nicht permanent das entsprechende Objekt bestrahlt.

S

Neben der Möglichkeit, das mechanische Verhalten von Zellen auf subzellulärer Ebene zu untersuchen, sind als Vorteile der Methode vor allem die einfache Handhabbarkeit, das Arbeiten unter ständiger mikroskopischer Kontrolle und die Kombination mit anderen mikroskopischen Techniken (DIC=Differential Interference Contrast Microscopy, Fluoreszenz, konfokale Mikroskopie) zu nennen. Dies ermöglicht es, auch auf lichtundurchlässigen Materialien zu arbeiten und simultan zum Deformationsverhalten wichtige biochemische Parameter (z. B. intrazelluläres Kalzium) zu untersuchen.

#### 10 Anwendungsbeispiele und Anwendungsperspektiven:

Da aus der Bestimmung viskoelastischer Eigenschaften wichtige Informationen über die Struktur des Cytoskeletts und insbesondere des kortikalen Aktins gewonnen werden können, ist die Methode von großer praktischer Bedeutung bei der Erforschung und Diagnose von Krankheiten, die mit Abnormalitäten des Cytoskeletts verbunden sind. So sind beispielsweise Krebszellen leichter deformierbar als nicht entartete Zellen (Ward et al.1991). Ebenfalls einsetzbar ist die Methode für Untersuchungen diverser Wirkstoffe (z.B. Pharmaka), hinsichtlich ihres Einflusses auf das Cytoskelett.

20 Da das Verfahren das Arbeiten auf lichtundurchlässigen Oberflächen erlaubt, ist ein weiteres Einsatzgebiet die Biomaterialforschung. Dabei geben mechanische Zellparameter Auskunft über die Biokompatibilität des als Zellträger verwendeten medizinisch oder zahnmedizinisch relevanten Materials (z.B. Keramik).

25 Von großem Interesse ist die Anwendung des Verfahrens auch bei der Erforschung der Rolle spezieller Nierenepithelzellen, den Podocyten, bei der Entstehung von Nierenerkrankungen. Die Podocyten besitzen ein kontraktiles System, das sich der Ausweitung der Kapillaren z.B. im Zuge einer glomerulären Hypertonie (einer Störung, die maßgeblich zum chronischen Nierenversagen beiträgt) entgegensetzt. Dabei sind die molekularen Veränderungen der Podocyten während der glomerulären Hypertonie noch weitgehend ungeklärt (Endlich, N., Sunohara, M., Nietfeld W., Wolski E. W., Schlewke D., Kranz G., Gretz N., Kritz W., Eikhoff H., Endlich K. [2002] **Analysis of differential gene expression in stretched podocytes enhances adaptation of podocytes to mechanical stress. FASEB J. 16, 1850-1852**). Im Rahmen dieser Problematik können mit der Methode Erkenntnisse auf Einzelzelebene gewonnen werden.

70

Weitere Merkmale der Erfindung ergeben sich aus der Beschreibung im Übrigen und aus den Ansprüchen. Nachfolgend werden Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand von Zeichnungen näher erläutert. Es zeigen:

- 5 Fig. 1 ein Präparat mit Träger und Laserlichtquelle in perspektivischer Darstellung,
- Fig. 2 eine Darstellung analog Fig. 1, jedoch mit einer anderen Einstellung der Laserlichtquelle,
- 10 Fig. 3 eine Draufsicht auf eine Einkoppeleinheit als Multistrahl-Pinzette,
- Fig. 4 die Einkoppeleinheit gemäß Fig. 3 in perspektivischer Darstellung.

15 Auf einem Deckglas 10 als Träger haftet eine adhärente biologische Zelle 11. Auf letzterer haftet ein Erythrozyt 12. Gut erkennbar ist dessen bikonkave Form. Der Erythrozyt liegt seitlich neben einem Zellkern 13 auf der Zelle 11.

Unter dem Deckglas 10 - also auf einer von der Zelle 11 abgewandten Seite - ist eine  
20 Laserlichtquelle 14 mit nicht näher gezeigten Einrichtungen zur Fokussierung und Steuerung des Laserstrahls als sogenannte optische Pinzette angeordnet. Ein Fokus 15 eines Laserstrahls 16 liegt auf Grund der hier vorgesehenen Einstellung der Laserlichtquelle 14 etwas unterhalb des Erythrozyten 12. Durch optisch induzierte Kräfte wird der Erythrozyt 12 in Richtung auf den Fokus 15 gezogen. Dadurch drückt der  
25 Erythrozyt 12 auf die Zelle 11 und verformt letztere in diesem Bereich. Die Verformung der Zelle 11 ist über eine nicht gezeigte optische Erfassung und Bildauswertung oder auf andere Weise messbar und kann wertvolle Hinweise auf die Eigenschaften und/den Zustand der Zelle 11 im weitesten Sinne liefern.

30 Fig. 2 zeigt eine Abwandlung gegenüber Fig. 1 dahingehend, dass hier der Fokus 15 oberhalb des Erythrozyten 12 liegt. Der Erythrozyt 12 wird wiederum in Richtung auf den Fokus 15 gezogen. Dabei kommt es hier auf Grund der Haftung zwischen Erythrozyt 12 und Zelle 11 zu einer zugbedingten Deformation der Zelle 11. Besonders wichtig ist hier die Stärke der Haftung zwischen der Zelle 11 und dem Erythrozyten 12.

35 Die Änderung der Lage des Fokus 15 relativ zum Erythrozyten 12 kann eingestellt werden durch die Änderung der Position der Laserlichtquelle 14 und/oder des Deckglases 10.

Außerdem kann der Fokus gegebenenfalls durch optische Beeinflussung im Bereich der Laserlichtquelle 14 verstellt werden. Bevorzugt ist eine Bewegung des Deckglases 10 durch geeignete dreidimensionale Antriebe.

5 Fig. 3 zeigt eine Einkoppeleinheit 17, die hier die Funktion einer speziellen optischen Pinzette hat und gegenüber dieser einige Zusatzfunktionen aufweist. Die wesentlichen Elemente der Einkoppeleinheit 17 sind in einem Gehäuse 18 angeordnet, das in den Fig. 3 und 4 offen dargestellt ist.

10 Im Bereich einer kleinen Stirnwand 19 ist ein Einlass für einen Laserstrahl OP (einer herkömmlichen optischen Pinzette) vorgesehen. Der Laserstrahl passiert eine Laserstrahlaufweitungsoptik aus zwei Linsen (oder Linsensystemen) OA1 und OA2. Der zweiten Linse OA2 ist ein System aus galvanischen Spiegeln GS1 und GS2 nachgeordnet. Die galvanischen Spiegel lenken den Laserstrahl um 90° um und können  
15 ihn zugleich aufsplitten zur Bildung einer Multistrahl-Pinzette. Mit einer derartigen Multistrahl-Pinzette können mehrere Erythrozyten und/oder Erythrozyten und Zellen simultan gehalten bzw. mit optisch induzierten Kräften beaufschlagt werden.

20 Der umgelenkte Laserstrahl tritt im Bereich einer größeren Seitenwand 20 aus dem Gehäuse 18 aus (Laserstrahl L). Im Bereich des Austritts ist ein Ringflansch R zum Anflanschen der Einkoppeleinheit 17 an ein nicht gezeigtes Mikroskop vorgesehen.

Nach Umlenkung des Laserstrahls durch die galvanischen Spiegel GS1, GS2 und vor Austritt des Laserstrahls aus dem Gehäuse 18 ist eine Einkoppelung von  
25 Fluoreszenzanregungslicht und/oder eines zweiten Laserstrahls vorgesehen. Die Einkoppelung erfolgt durch einen Umlenkspiegel LFU.

Außen an einer kleinen Stirnwand 21, der Stirnwand 19 gegenüberliegend, ist eine HBO (Quecksilberdampflampe) -Einkoppeleinheit FE für die Fluoreszenzmikroskopie  
30 angeordnet. Die Einheit FE kann auch aus einem weiteren Laser für die Fluoreszenzanregung bestehen. Das Licht der Einheit FE tritt entgegengesetzt parallel zum Laserstrahl OP aber seitlich versetzt zu diesem in das Gehäuse 18 ein und trifft auf den Umlenkspiegel LFU, sodass der Laserstrahl L das Fluoreszenzanregungslicht und den Strahl der optischen Pinzette OP enthält. Zwischen der Einheit FE und dem  
35 Umlenkspiegel LFU kann eine Irisblende I oder ein Fluoreszenzanregungsfilter im Gehäuse 18 oder außerhalb desselben angeordnet sein.



Ein zweiter Laserstrahl LMS, insbesondere ein Lasermikrostrahl, vorzugsweise als gepulster Laser, ist in die beschriebenen Strahlen einkoppelbar. Hierzu weist das Gehäuse im Bereich einer der Seitenwand 20 gegenüberliegenden Seitewand 22 einen Eintritt für den Lasermikrostrahl LMS auf, welcher parallel zum Laserstrahl L und mit

5 seitlichem Abstand zu diesem gerichtet ist. Innerhalb des Gehäuses 18 ist für den Lasermikrostrahl LMS ein Linsenaufweitungssystem MSA angeordnet.

Der Strahl LMS wird vorzugsweise entlang einer optischen Achse des von der Einheit FE kommenden Lichts dem Umlenkspiegel LFU zugeführt. Hierzu ist ein Umlenkspiegel LU

10 im Lichtstrahl der Einheit FE angeordnet, der den Lasermikrostrahl LMS (nach dem Aufweiten) in Richtung auf den Umlenkspiegel LFU reflektiert.

Durch die beschriebene Anordnung der einzelnen Einheiten und Elemente ist die Einkoppeleinheit 17 äußerst kompakt und raumsparend aufgebaut.

15

\*\*\*\*

Anmelder:

Dr. Shamci Monajembashi  
Turnerstraße 116

69126 Heidelberg

16. April 2003/7521  
MJB-11-DE

Bezugszeichenliste:

10	Deckglas	LFU	Umlenkspiegel zum gleichzeitigen
11	Zelle		Umlenken von Fluoreszenzlicht und zweiten
12	Erythrozyt		Laserstrahl
13	Zellkern		
14	Laserlichtquelle	LMS	Lasermikrostrahl (gepulster Laser)
15	Fokus		
16	Laserstrahl	LU	Umlenkspiegel für den zweiten Laser
17	Einkoppeleinheit		(LMS)
18	Gehäuse		
19	kleine Stirnwand	MSA	Linsenaufweitungssystem für den
20	Seitenwand		zweiten Laser (LMS)
21	kleine Stirnwand		
22	Seitenwand	OA1, OA2	Laserstrahlaufweitungsoptik
FE	HBO Einkoppeleinheit für Fluoreszenzmikroskopie	OP	Laserstrahl der optischen Pinzette
GS1, GS2	galvanische Spiegel zum Aufsplitten des Laserstrahls der optischen Pinzette (Multistrahl-Pinzette)	R	Ringflansch zum Anflanschen der Einkoppeleinheit 17 an das nicht gezeigte Mikroskop
I	Irisblende oder Fluoreszenzanregungsfilter		
L	einkoppelte Laserstrahlen und Fluoreszenzanregungslicht im Mikroskop		

**MEISSNER, BOLTE & PARTNER**

Anwaltssozietät GbR

Anmelder:

Dr. Shamci Monajembashi  
Turnerstraße 116

69126 Heidelberg

Adresse:

Hollerallee 73  
D-28209 Bremen  
Telefon +49-421-348740  
Telefax +49-421-342296

Unser Zeichen: MJB-11-DE

Datum: 16. April 2003/7521

---

Präparat, insbesondere für die Handhabung mittels einer optischen Pinzette, sowie  
Verfahren und Vorrichtung zur Erzeugung von optisch induzierten Kräften

---

Patentansprüche:

1. Präparat, insbesondere für die Handhabung mittels einer optischen Pinzette, enthaltend ein oder mehrere Zielobjekte und ein oder mehrere Hilfsobjekte, wobei mindestens ein Hilfsobjekt mindestens einem Zielobjekt zugeordnet ist, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Hilfsobjekte Hämoglobin enthalten.
- 5 2. Präparat nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Hilfsobjekte jeweils eine bikonkave Form aufweisen.
- 10 3. Präparat nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Hilfsobjekte rote Blutkörperchen (Erythrozyten) sind.
4. Präparat nach Anspruch 1 oder einem der weiteren Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Hilfsobjekte Liposomen sind, die Hämoglobin enthalten.
- 15 5. Präparat nach Anspruch 1 oder einem der weiteren Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Hilfsobjekte mit einer Substanz beschichtet sind, deren Oberflächenladung (Vorzeichen) der Oberflächenladung (Vorzeichen) der Zielobjekte entgegengerichtet ist.

6. Präparat nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass als Substanz zur Beschichtung positiv geladene Polymere vorgesehen sind, die keine reaktiven Gruppen aufweisen.
- 5 7. Präparat nach Anspruch 1 oder einem der weiteren Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Hilfsobjekte mit Polyethylenimid oder Poly-L-Lysin beschichtet sind.
- 10 8. Präparat nach Anspruch 1 oder einem der weiteren Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass als Zielobjekte biologische Zellen vorgesehen sind.
- 15 9. Präparat nach Anspruch 1 oder einem der weiteren Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Zielobjekte auf einem Träger und die Hilfsobjekte auf den Zielobjekten haften.
- 10 11. Verfahren nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Hilfsobjekte vor dem Aufbringen auf die Zielobjekte mit Substanzen beschichtet werden, die eine Oberflächenladung ändern, derart, dass Zielobjekte einerseits und Hilfsobjekte andererseits Oberflächenladungen mit unterschiedlichen Vorzeichen aufweisen.
- 25 12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Hilfsobjekte an den Zielobjekten haften.
- 30 13. Verfahren nach Anspruch 10 oder einem der weiteren Ansprüche, dass ein Zielobjekt, an dem mindestens ein Hilfsobjekt haftet/anliegt, mittels zweier optischer Strahlen deformiert/gedehnt wird.
- 35 14. Vorrichtung zur Erzeugung von optischen Kräften, im Fokus einer optischen Pinzette auf dehnbare oder deformierbare Zielobjekte, wie z.B. biologische Zellen, **gekennzeichnet durch** Einkopplung eines einfachen oder eines mehrfachen Laserstrahls der optischen Pinzette im Strahlengang eines Mikroskops, sodass das Zielobjekt in den Fokus hineingezogen bzw. hineingedrückt wird.



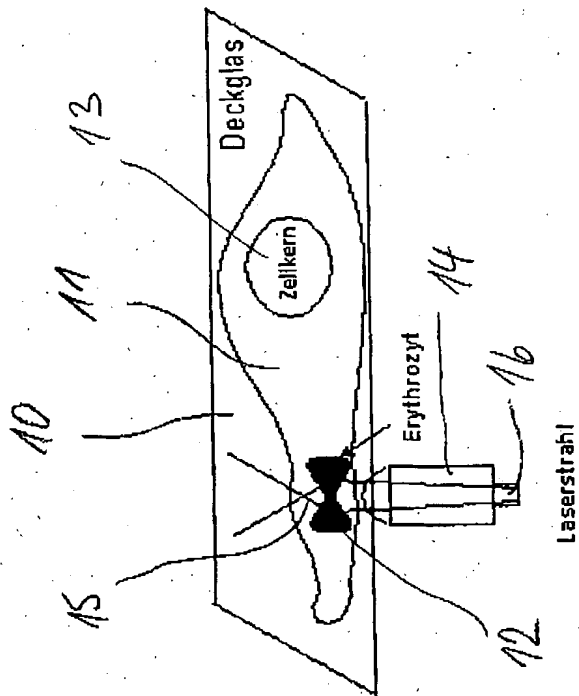
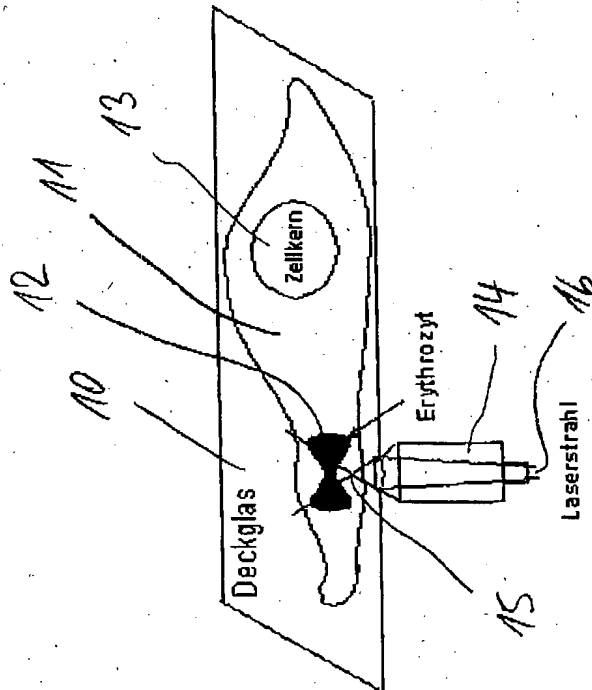
26

15. Vorrichtung nach Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet**, dass ein langwelliger Laserstrahl direkt oder mittels Lichtwellenleiter über ein Linsensystem in das Mikroskop bzw. die optische Pinzette eingekoppelt wird.

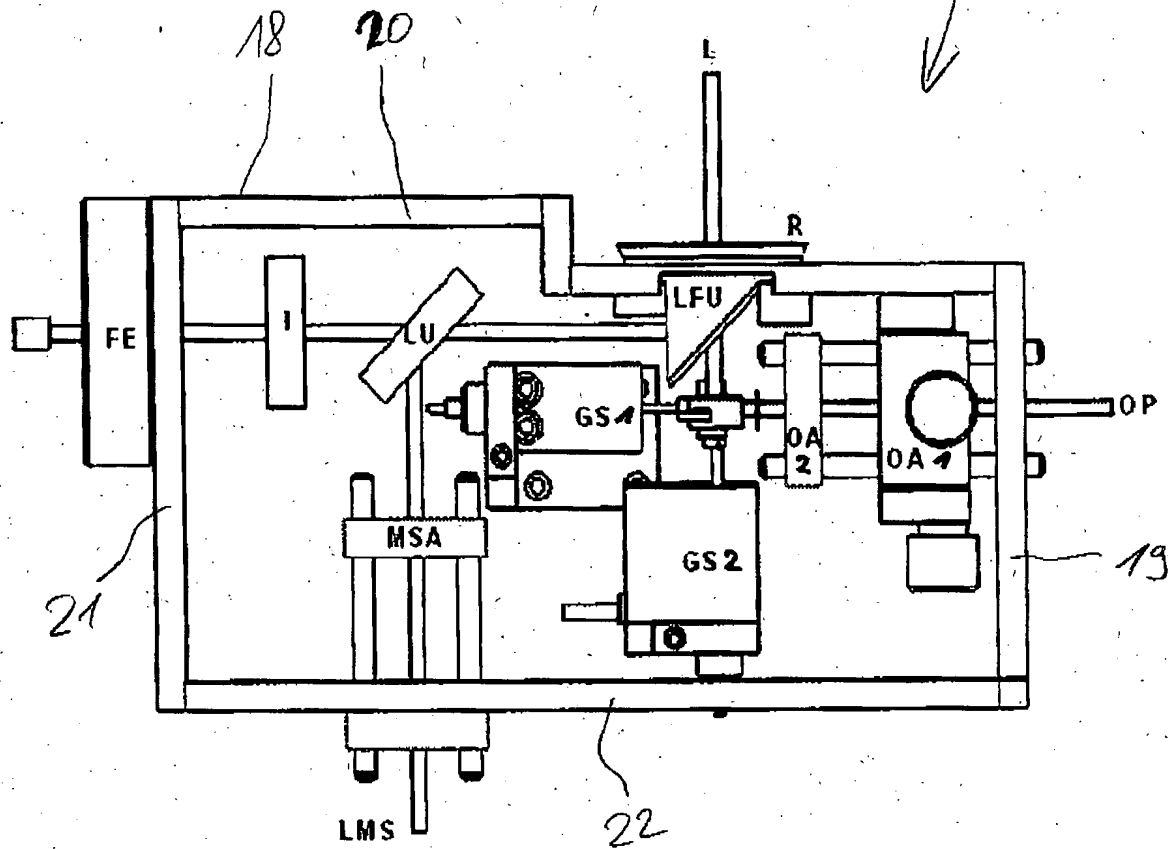
5 16. Vorrichtung nach Anspruch 14 oder 15, **gekennzeichnet durch** optische Elemente zum Aufsplitten des Laserstrahls und zur Bildung einer Multistrahl-Pinzette.

17. Vorrichtung nach Anspruch 14 oder einem der weiteren Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Mikroskop ein CLSM (Confocal Laser Scanning Microscope)  
10 ist.

\*\*\*\*\*

Fig. 2Fig. 1

lc

Fig. 3

